

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



# [12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200580018895.0

[51] Int. Cl.

A61K 31/715 (2006.01)

C07H 1/00 (2006.01)

[43] 公开日 2007 年 5 月 16 日

[11] 公开号 CN 1964722A

[22] 申请日 2005.5.10

[21] 申请号 200580018895.0

[30] 优先权

[32] 2004.5.10 [33] US [31] 60/569,559

[86] 国际申请 PCT/US2005/016229 2005.5.10

[87] 国际公布 WO2006/085895 英 2006.8.17

[85] 进入国家阶段日期 2006.12.8

[71] 申请人 生物聚合物工程有限公司

地址 美国明尼苏达州

共同申请人 路易斯维尔大学研究基金会

[72] 发明人 比尔·库尔尼卡基斯

特鲁尼塔·乔·多克特尔·罗斯

史蒂文·J·卡雷尔

丹尼尔·K·康纳斯

[74] 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

代理人 林晓红

权利要求书 2 页 说明书 31 页 附图 9 页

[54] 发明名称

与抗生素、疫苗和病毒单克隆抗体组合的全葡聚糖颗粒

[57] 摘要

本发明涉及利用全葡聚糖颗粒和药剂的组合物及方法。全葡聚糖颗粒通过与 C3 补体蛋白受体 CR3 结合而增强先天免疫系统的杀肿瘤活性。这种结合可增强先天免疫系统的细胞毒性作用并刺激活化细胞因子的释放，并增强机体对药剂的应答。

1. 治疗流感的方法，包括口服施用全葡聚糖颗粒。
2. 治疗鼻病毒的方法，包括口服施用全葡聚糖颗粒。
3. 治疗细菌感染的方法，包括口服施用全葡聚糖颗粒以及抗所述细菌感染的抗生素。
4. 权利要求 3 的方法，其中所述抗生素是环丙沙星。
5. 治疗病毒或细菌感染的方法，包括口服施用全葡聚糖颗粒、以及疫苗或活化补体的单克隆抗体或活化补体的多克隆抗体。
6. 增强葡聚糖介导的经补体系统的免疫原性应答的方法，包括给个体施用口服生物可利用的治疗有效量的全葡聚糖颗粒和药剂，其中所述药剂激活补体系统且葡聚糖增强免疫原性应答，由此增强所述药剂的活性。
7. 权利要求 6 的方法，其中药剂是病毒或细菌的单克隆抗体或疫苗。
8. 权利要求 6 的方法，其中经口服施用的葡聚糖被巨噬细胞摄取，并被转运到骨髓和其它免疫器官内，降解以及所释放的片段激活免疫原性细胞。
9. 治疗人类或动物体内的一种或多种感染性病原体所造成的病毒感染或预防其发病的方法，包括给人或动物施用预防或治疗有效量的全葡聚糖颗粒和抗病毒药剂，其中所述药剂激活补体系统且葡聚糖通过增强所述药剂的活性而增强免疫原性应答。
10. 治疗人类或动物体内的一种或多种感染性病原体所造成的细菌感染或预防其发病的方法，包括给人或动物施用预防或治疗有效量的全葡聚糖颗粒和抗生素，其中所述药剂激活补体系统且葡聚糖通过增强所述药剂的活性而增强免疫原性应答。
11. 治疗人类或动物体内的一种或多种感染性病原体所造成的感染

或预防其发病的方法，包括给人或动物施用预防或治疗有效量的全葡聚糖颗粒和抗所述感染性病原体的疫苗，其中所述疫苗激活补体系统且葡聚糖通过增强疫苗的活性而增强免疫原性应答。

12. 权利要求 1 的方法，其中所施用的葡聚糖的剂量范围是约 0 到约 6000mg/天或约 0 到约 100mg/kg/天。

## 与抗生素、疫苗和病毒单克隆抗体组合的全葡聚糖颗粒

### 相关申请

本申请要求 2004 年 5 月 10 日提交的美国临时申请 No. 60/569,559 的优先权。在此通过引用将上述申请的全部内容并入本申请。

### 政府资助

本发明全部或部分受国立卫生研究所/国立癌症研究所基金 RoICA86412 以及美国国防部基金 BC010287 的资助。政府拥有本发明的某些权益。

### 背景技术

$\beta$ -葡聚糖是一种复杂的碳水化合物，其一般源自包括酵母、细菌、真菌和植物（某些谷物）在内的一些来源。这些来源提供了具有不同混合物形式、纯度以及结构的 $\beta$ -葡聚糖。糖分子能以不同的方式连接产生具有不同物理性能和生物性能的化合物，这造成了 $\beta$ -葡聚糖的结构多样性。例如，源自细菌和藻类的 $\beta(1,3)$ -葡聚糖是线性的，使得其能作为食品增稠剂。香菇多糖（来自香菇(*Lentinus edodes*)，担子菌科）是高分子量的 $\beta$ -葡聚糖，其具有每隔 3 个残基自(1,3)骨架分出的 $\beta(1,6)$ -分支。

裂褶多糖（来自裂褶菌(*Schizophyllum commune*)，担子菌科）与香菇多糖相似，但是其具有更短的 $\beta(1,6)$ -侧链。来自大麦、燕麦或小麦的 $\beta$ -葡聚糖在其骨架中具有混合的(1,3)-和(1,4)- $\beta$ -连接，但是没有(1,6)- $\beta$ -侧链，并且通常是高分子量的。侧链频率——已知其为取代或分支频率的程度——调节二级结构和可溶性。源自酵母的 $\beta$ -葡聚糖具有 $\beta(1,3)$ -连接的葡萄糖单位的骨架以及低度的经 $\beta(1,6)$ -连键的分子间和分子内分支。根据

大量已发表的研究，被广泛接受的是，依据所获得的产物的纯度和活性，面包酵母（啤酒糖酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)) 是优选的 $\beta(1,3)$ -葡聚糖的来源。

啤酒糖酵母的细胞壁主要由 $\beta$ -葡聚糖构成，这构成了细胞壁的形状和机械强度。虽然公知酵母作为食物级生物体的用途，酵母也被用作酵母聚糖的来源，酵母聚糖是一种用于刺激非特异性免疫应答的粗制的不可溶的提取物。酵母的酵母聚糖是 $\beta(1,3)$ -葡聚糖的丰富来源。酵母来源的 $\beta(1,3)$ -葡聚糖表现出能刺激免疫系统，部分是通过激活先天免疫系统，这是机体对抗真菌感染的基本防御的一部分。酵母 $\beta(1,3)$ -葡聚糖是由经 $\beta(1,3)$ -连接的葡萄糖分子以及周期性的经 $\beta(1,6)$ -连键连接的 $\beta(1,3)$ -分支所构成的多糖，更正式地被称作聚(1,6)- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖基-(1,3)- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖。根据来源和分离方法，葡聚糖在结构上及功能上都有所不同。

$\beta$ -葡聚糖具有多样的活性。 $\beta$ -葡聚糖增强非特异性免疫和感染抗性的能力都与内毒素相似， $\beta$ -葡聚糖作为免疫佐剂和造血刺激剂的活性与更复杂的生物学应答调节剂例如卡介苗和短小棒状杆菌(*Corynebacterium parvum*)相当。酵母 $\beta$ -葡聚糖的功能活性也与从真菌和植物中分离到的那些结构相似的碳水化合物相当。这些更高分子量的(1,3)- $\beta$ -D-葡聚糖例如裂褶多糖、香菇多糖、云芝多糖(krestin)、奇果菌素(grifolan) 和茯苓多糖(pachyman)表现出相似的免疫调节活性。在动物模型中已经测试了各种剂型的颗粒的和可溶性的 $\beta$ -葡聚糖，以阐明其生物学活性。可溶性和不可溶性 $\beta$ -葡聚糖单独使用或用作病毒和细菌抗原的疫苗佐剂已经显示出其能显著地增加对各种细菌、真菌、原虫和病毒感染的抗性。 $\beta$ -葡聚糖的造血作用包括增加外周血白细胞数目和骨髓及脾脏的细胞密度，反映出粒细胞-巨噬细胞祖细胞、脾脏多能干细胞和红系祖细胞数目的增加，以及粒细胞-单核细胞集落刺激因子 (GM-CSF) 的血清水平的增加。

$\beta$ -葡聚糖作用的分子机制涉及免疫细胞例如中性粒细胞和巨噬细胞的细胞膜上的特异的 $\beta$ -葡聚糖受体结合位点。甘露聚糖、半乳聚糖、 $\alpha(1,4)$ -

连接的葡萄糖聚合物不具有与该受体的亲和力。最新数据提示 C3 补体蛋白的受体 CR3 可作为 $\beta$ -葡聚糖的主要受体。配体与 $\beta$ -葡聚糖受体的结合造成了补体激活、吞噬作用、溶酶体的酶释放、以及前列腺素、血栓素和白三烯的生成。在已有技术中所述的绝大多数 $\beta$ -葡聚糖制剂都刺激了细胞因子例如 IL-1 和 TNF 的生成，已知这些细胞因子具有抗肿瘤活性。

单独的抗生素、抗病毒剂和其它药剂并非一直都是有效的。特别地，随着抗生素耐药性菌株数目的增加，就存在着开发用于强化这些药剂的有效性的方法的需要。

## 发明内容

如在此所述的那样，本发明涉及包括 $\beta(1,3:1,6)$ -葡聚糖和一种药剂例如抗生素、抗病毒剂、抗体、疫苗或其组合的组合物的用途。

本发明描述了包括生物可利用的颗粒的 $\beta(1,3:1,6)$ -葡聚糖和一种药剂的组合物，其中葡聚糖经补体系统促进免疫应答且所述药剂活化补体。在某些实施方式中，药剂是抗病毒剂例如病毒的抗体、疫苗例如流感疫苗、抗鼻病毒剂、和抗生素或上述各项之各种组合。

在某些实施方式中，本发明涉及一种增强葡聚糖介导的经补体系统的免疫原性应答的方法，包括给个体施用口服生物可利用的治疗有效量的全葡聚糖颗粒 (whole glucan particles) 和药剂，其中所述药剂激活补体系统，且所述葡聚糖增强免疫原应答，由此增强药剂的活性。

口服施用的葡聚糖被巨噬细胞摄取，并被转运到骨髓，降解以及所释放出的片段激活免疫原性细胞。

本发明还涉及治疗人体或动物体内的一种或多种感染性病原体 (infectious agent) 所造成的病毒感染或预防其发病的方法，包括给人或动物施用预防或治疗有效量的全葡聚糖颗粒和抗病毒剂，其中葡聚糖激活免疫应答，且免疫应答增强抗病毒剂的作用。

在另一个方面，本发明提供了治疗人体或动物体内的一种或多种感

染性病原体所造成的细菌感染或预防其发病的方法，包括给人或动物施用预防或治疗有效量的全葡聚糖颗粒和抗生素，其中药剂激活补体系统，且葡聚糖促进免疫应答，以增强抗生素的作用。

本发明也涉及治疗人体或动物体内的一种或多种感染性病原体所造成的感染或预防其发病的方法，包括给人或动物施用预防或治疗有效量的全葡聚糖颗粒和抗所述感染性病原体的疫苗，其中药剂激活补体系统且葡聚糖启动免疫应答，由此免疫应答增强抗病毒剂的作用。

在此所述的方法中，可以施用的葡聚糖剂量范围是从约 0 到约 6000mg/天或约 0 到约 100mg/kg/天。

#### 附图说明

通过以下对如附图中所举例说明的本发明的优选实施方式进行更为具体的描述，可以清楚地看到本发明以上所述的和其它的目的、特点和优点。

图 1 是显示实施例 1 的 WGP 与未治疗组相比较的生存数据的图。

图 2 是显示一个全身预防性剂量的 WGP、可溶性葡聚糖和对照获得的生存数据的图。

图 3 是显示在 CFU/肺研究中用一个全身预防性剂量的 WGP、可溶性葡聚糖和对照治疗的图。

图 4 是显示一个全身预防剂量的 WGP、可溶性葡聚糖和对照在细菌动物模型中的有效性的图。

图 5 是显示口服剂量 2mg 和 20mg WGP 治疗 8 天获得的生存率的图。

图 6 是显示一周 4 次预防剂量的 2 mg /kg WGP 获得的生存率的图。

图 7 是显示暴露 10 天后以 13.3mg 和 1.5mg WGP 获得的生存率的图。

图 8 是显示每日预防性口服剂量的 WGP  $\beta$ -葡聚糖的抗流感保护作用的图。

图 9 是显示经  $^{60}\text{Co}\gamma$ 照射的 B6D2F1/J 小鼠在受克雷伯杆菌皮下攻击

后的生存率的图。

### 具体实施方式

下面是对本发明的优选实施方式的描述。

全葡聚糖颗粒 (WGP) 包括纯化的、不可溶的酵母细胞壁的制剂。通过去除甘露聚糖蛋白外层以及暴露出 $\beta$ -葡聚糖,同时保留葡聚糖的体内形态可以生成 WGP。

全葡聚糖颗粒是酵母细胞壁的残余物,通过将生长着的酵母从其生长培养基中分离出来,并对完整的酵母细胞壁进行碱处理以便去除不需要的蛋白和核酸物质,制备出全葡聚糖颗粒。在某些实施方式中,剩余物质是去除了外层甘露聚糖蛋白的球形 $\beta$ -葡聚糖颗粒。可以从任一含葡聚糖的细胞壁来源中获得全葡聚糖颗粒,但是优选的来源是啤酒糖酵母。在某些实施方式中,制剂中的葡聚糖含量超过 50%葡聚糖。残余物是由细胞内的脂类和/或糖原构成。这些不可溶的颗粒已经显示出可以增强宿主对多种感染的抗性、增加抗体生成 (佐剂活性)、增加白细胞动员、以及增强伤口愈合。生成 WGP 的方法在本领域是已知的,并在美国专利 No. 4,810,646、4,492,540、5,037,972、5,082,936、5,250,436、和 5,506,124 中有所描述,在此通过引用将其全部内容并入本申请。

微颗粒的葡聚糖颗粒在此被定义为全葡聚糖颗粒的一部分,通过将酵母细胞壁 $\beta(1,3:1,6)$ 葡聚糖精细地碾磨成大小约 1 微米或更小的颗粒可以生成微颗粒的葡聚糖颗粒。微颗粒的 $\beta$ -葡聚糖也已经显示出增强宿主的免疫系统。见美国专利 No. 5,223,491 和 5,576,015,在此通过引用将其全部内容并入本申请。

已经制备出了各种形式的 $\beta$ -葡聚糖。一个实例是通过将酵母细胞壁 $\beta(1,3:1,6)$ 葡聚糖精细地碾磨成大小约 1 微米或更小的颗粒的微颗粒的全葡聚糖颗粒,这种形式的 $\beta$ -葡聚糖已经被描述用作营养补充剂和皮肤修复剂,例如在 Donzis 的美国专利 No. 5,702,719 中所述的那样。其他用于在



此所述的方法中的颗粒葡聚糖是从 Biopolymer Engineering, Inc., Eagan, MN 获得的 WGP™ Beta Glucan 和 BetaRight™。

微颗粒的 $\beta$ -葡聚糖也已经显示出能增强宿主的免疫系统。见美国专利 No. 5,223,491 和 5,576,015，在此通过引用将其全部内容并入本申请。

在此所述的是包括 $\beta(1,3:1,6)$ -葡聚糖和一种药剂 (agent) 的组合物，其中 $\beta(1,3:1,6)$ -葡聚糖刺激免疫系统并通过触发(priming)机体而提高药剂的作用能力。在某些实施方式中，用于在此所述的方法中的组合物的全葡聚糖颗粒是口服的生物可利用的剂型。“生物可利用的”在此意思是全葡聚糖颗粒能到达作用的靶点，换句话说，被施用的全葡聚糖颗粒能为 Peyer 斑摄取葡聚糖提供足够多的所暴露的 $\beta(1,3:1,6)$ -葡聚糖。葡聚糖被摄取至 Peyer 斑内，被巨噬细胞内吞并降解，然后被转运到骨髓内，其中释放出所降解的片段。所释放出的降解片段与骨髓内的中性粒细胞结合，通过化学趋化作用迁移到达靶点并与之结合，而在靶点处补体已经被所沉积的 iC3b 激活。例如，在此所述的组合物中的 WGP 能到达靶细胞并与药剂一同作用于靶细胞，并增强药剂的活性。

在作用位点上，葡聚糖可刺激细胞，这是葡聚糖与 CR3 受体结合或联合的结果。所述结合造成了 CR3 的触发和/或启动。通过降解葡聚糖颗粒的胃肠道巨噬细胞将 WGP 转运到骨髓，介导了口服 WGP 的生物可利用性。然后，当中性粒细胞迁移到细胞并与沉积有 iC3b 的细胞结合时，所降解的颗粒作为中性粒细胞的刺激剂经 CR3 活化作用于骨髓。结合药剂的活性，经葡聚糖对免疫系统的激活使得机体能更好地应答于所述药剂。

$\beta$ -葡聚糖是一种公知的生物学应答调节剂 (biological response modifier, BRM)，其以与粒细胞单核细胞集落刺激因子 (GM-CSF) 类似的方式刺激造血作用 (血细胞生成)。这些研究最初用颗粒 $\beta$ -葡聚糖进行，后来用可溶性 $\beta$ -葡聚糖进行，所有的这些都被静脉内施用给小鼠 (Patchen M. L., et al., J. Biol. Response Mod. 3:627-633 (1984); Patchen, M. L., et al,

Experientia 40:1240-1244 (1984); Petruczenko, A. Acta. Physiol. Pol. 35:231-236 (1984) 和 Patchen, M. L. and T. J. MacVittie., Int. J. Immunopharmacol. 7:923-932 (1985))。当静脉内给予 $\beta$ -葡聚糖时,暴露于500-900cGy  $\gamma$ 射线的小鼠表现出血白细胞、血细胞和红细胞计数的明显的恢复 (Patchen, M. L. and T. J. MacVittie. J. Biol. Response Mod. 5:45-60 1986 和 Patchen, M. L., et al, Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol. 8:151-155 (1986))。其他报道显示, $\beta$ -葡聚糖能逆转化疗药物例如氟尿嘧啶 (Matsuo, T., et al, Jpn. J. Cancer Chemother. 14:1310-1314 (1987)) 或环磷酰胺 (Wagnerova, J., et al, Immunopharmacol Immunotoxicol 15:227-242 (1993) 和 Patchen, M. L et al, Exp. Hematol. 26:1247-1254 (1998)) 所产生的骨髓抑制。此外, $\beta$ -葡聚糖的抗感染活性联合其刺激造血的活性提高了接受致死剂量 900-1200cGy 照射的小鼠的生存率。体外研究显示,当分别联合 GM-CSF 和白介素-3 (IL-3) 时, $\beta$ -葡聚糖能通过造血干祖细胞提高粒细胞和巨核细胞集落的形成 (Turnbul L. J. L et al, Acta Haematol 102:66-71 (1999))。在 GM-CSF 刚开始作为一种治疗药物的时候认为开发 $\beta$ -葡聚糖的造血活性是不值得的。做了很多显示出 $\beta$ -葡聚糖的放射保护性作用的早期研究的三军放射生物学研究所 (AFRRI) 也认为 $\beta$ -葡聚糖能用于保护暴露于核电站事故或核战争所造成的辐射的个体。但是, $\beta$ -葡聚糖需要静脉内施用这一点使得其不适用于快速地治疗这种紧急状态中的大量受害者。

如在此所述的那样,已经认识到了  $\beta$ -葡聚糖的口服免疫调节活性以及与各种药剂例如疫苗共施用相关的益处。相信肠道 Peyer 斑中的 M (微皱) 细胞对某些  $\beta$ -葡聚糖的口服摄取造成了  $\beta$ -葡聚糖被呈递给下层的肠道相关淋巴组织 (GALT) 中的巨噬细胞,对免疫系统的这种方式的激活造成机体增加了对共施用的药剂的应答。

口服给药的蘑菇  $\beta$ -葡聚糖已经显示出能激活腹膜的和肺泡的巨噬细胞。此外,已经发现口服施用 Shitake 蘑菇衍生的  $\beta$ -葡聚糖 (香菇多糖) 增

加了小鼠血液中的 T 辅助细胞数目。在临床前研究和临床研究中都显示出,口服  $\beta$ -葡聚糖也已经显示出能诱导抗感染的活性 (Hotta, H., IC. et al, *Int. J. Immunopharmacol* 15:55-60 (1993) 和 Vetvicka, V., K. J. Amer. *Nutrit. Assoc.* 5:1-5 (2002)) 和抗肿瘤的活性 (Nanba, H., K. et al, *Chem. Pharm. Bull (Tokyo)* 35:2453-2458 (1987); Suzuki, L, T. et al, *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* 39:1606-1608 (1991) 和 Toi, M., T. et al, *Cancer* 70:2475-2483 (1992))。无意于受理论上的束缚,  $\beta$ -葡聚糖通过刺激宿主免疫防御机制 (主要是巨噬细胞、中性粒细胞、NK 细胞和树突状细胞) 而发挥作用, 继而提高微生物和肿瘤细胞的清除以及随后降低发病率 (Onderdonk, A., et al, *Infect. Immun.* 60:1642-1647 (1992) 和 Kaiser, A. B. and D. S. Kernodle., *Antimicrob. Agents Chemother.* 42:2449-2451 (1998))。

酵母衍生的  $\beta(1,3;1,6)$ -葡聚糖部分通过刺激先天的抗真菌免疫机制发挥对抗细菌、真菌、寄生虫、病毒和癌症等多种致病性攻击的作用。用于确定  $\beta$ -葡聚糖的作用机制的研究已经显示, 它们通过触发巨噬细胞、中性粒细胞、单核细胞和 NK 细胞, 赋予这些细胞增强了的杀灭微生物病原体或肿瘤细胞的能力而发挥作用, 具有不同结构的不同来源的  $\beta$ -葡聚糖已经显示出与各种受体的亲和力。甘露聚糖、半乳聚糖、 $\alpha(1,4)$ -连接的葡萄糖聚合物以及  $\beta(1,4)$ -连接的葡萄糖聚合物不具有结合位于细胞上的受体的亲和力。已经表征出白细胞上的两种  $\beta$ -葡聚糖结合受体, 它们通过与  $\beta$ -葡聚糖结合而发挥促进吞噬酵母细胞壁的作用。首先, iC3b 受体 CR3 (也称作 Mac-1、CD11b/CD18、或  $\alpha_M\beta_2$ -整联蛋白) 显示出具有结合  $\beta$ -葡聚糖的凝集素位点, 它们在中性粒细胞、单核细胞和巨噬细胞吞噬酵母细胞壁中发挥作用 (Ross, G. D., et al, *Complement Inflamm.* 4:61-74 (1987) 和 Xia, Y., V. et al, *J. Immunol* 162:2281-2290 (1999))。Mac-1/CR3 作用为介导白细胞渗透通过内皮的粘附分子以及作用为造成对微生物的吞噬/脱颗粒应答的补体的 iC3b 片段的受体。Mac-1/CR3 具有许多与其他整联蛋白相同的功能特征, 包括通过源自细胞浆内结构域或

细胞外区域的构象变化而发生的双向的信号传导。关于其功能的另一个关键点是其与糖基磷脂酰肌醇 (GPI) 锚定的受体例如 FcγRIIIB (CD16b) 或 uPAR (CD87) 形成膜复合物的能力, 这为这些外膜结合受体提供了跨膜的信号传导机制, 这容许它们介导细胞骨架依赖性的粘附作用或吞噬作用和脱颗粒作用。许多功能表现出依赖于膜近端的作用为识别微生物表面多糖或 GPI 连接的信号伴侣的凝集素位点。因为 Mac-1/CR3 在促进中性粒细胞炎性应答中的重要性, 对抗其功能的治疗策略已经显示出治疗自身免疫性疾病和缺血/再灌注损伤的希望。相反地, 与其凝集素位点相结合的可溶性 β-葡聚糖多糖启动了循环巨噬细胞和天然杀伤 (NK) 细胞的 Mac-1/CR3, 容许应答于受 iC3b 调理的肿瘤细胞的细胞毒的脱颗粒作用, 否则这些肿瘤细胞将逃脱这种细胞介导的细胞毒作用的机制。CR3 以高亲和力 ( $5 \times 10^{-8} \text{M}$ ) 与可溶性的真菌 β-葡聚糖结合, 这启动了巨噬细胞或 NK 细胞的受体, 造成了应答于带有 iC3b 的肿瘤细胞的细胞毒的脱颗粒作用。在缺乏血清 C3 (补体 3) 或白细胞 CR3 的小鼠中没有发生可溶性 β-葡聚糖在正常小鼠中所促进的抗肿瘤应答, 提示在 β-葡聚糖的抗肿瘤作用中需要肿瘤上的 iC3b 和白细胞上的 CR3 (Vetvicka, V., et al, J. Clin. Invest. 98:50-61 (1996) 和 Yan, J., V. et al., J. Immunol. 163:3045-3052 (1999))。

Dectin-1 代表 β-葡聚糖的第二种膜受体, 其涉及于葡聚糖颗粒的吞噬作用。Dectin-1 被高水平地表达于巯基乙酸酯引发的腹膜巨噬细胞, 且其活性明显超过了在这些活化细胞通过 β-葡聚糖结合对酵母的吞噬作用中的 CR3 活性。但是, 用抗 CR3 可以阻断中性粒细胞和常驻腹膜巨噬细胞对酵母的吞噬作用, 但是在 CR3 缺乏 ( $\text{CD11b}^{-/-}$ ) 的中性粒细胞或常驻巨噬细胞中却没有出现这种情况。此外, NK 细胞不表达 Dectin-1, 在用 β-葡聚糖触发之后, 其用 CR3 介导抗受 iC3b 调理的乳腺癌细胞的抗肿瘤活性。因此, Dectin-1 在介导 β-葡聚糖活性中的作用显示出被限制于活化的腹膜巨噬细胞以及可能的在本研究中观察到含有 WGP-DTAF 的肠道

CR3<sup>+</sup>巨噬细胞。

### 免疫刺激性能

在此所述的方法和组合物利用联合药剂（例如病毒抗体、疫苗、抗生素）的全葡聚糖颗粒增加、刺激、激活、强化、或调控细胞或体液水平的免疫应答。利用在此所述的组合物和方法的作用模式可能是非特异性的（例如造成了对大量抗原的免疫应答性的增加）、或者是抗原特异性的（例如影响对较窄的细胞和/或抗原组的限制型的免疫应答）。

本发明的组合物和方法不仅可以促进免疫细胞的活化和增殖，也促进了它们的募集。因此，施用本发明的组合物利用 WGP 和补体的相互作用促进了免疫细胞迁移到特异的区域例如肿瘤内，其中免疫细胞已经被激活和扩增，并将药剂转运到靶点（例如肿瘤）内，然后药剂在靶位点发挥作用。虽然应答于本发明的性能的活化和扩增可以是非特异性的，在免疫细胞的邻近部位所存在的药剂（例如抗体、疫苗、抗生素）推动了抗原特异性应答的进展。

本发明的组合物含有给个体提供益处的药剂，同时具有葡聚糖的免疫调节的性能。在某些实施方式中，单一制剂内的组合物不仅提供了药剂的益处，而且通过转运葡聚糖的作用以及激活补体级联的作用促进了这些相关药剂向免疫细胞的呈递和转运。

药剂可以被掺入到葡聚糖颗粒内，或与葡聚糖颗粒混和、共价连接，或者以悬浮液、乳剂或其他介质提供药剂。

在某些实施方式中，所阐述的系统和共施用的益处是制剂可以被加工成在单一组合物中还含有药剂。因此，通过包含药剂可以进一步地增强使用全葡聚糖颗粒制剂所提供的益处。因此，在本发明的一个实施方式中，制剂是掺入了药剂的葡聚糖。例如，预期的组合物是全葡聚糖颗粒以及掺入于其中的病毒抗体。

然后，制剂可以被直接地引入到靶点内，因此不仅通过葡聚糖与凝

集素位点的结合以及补体的激活造成了免疫细胞的募集和潜在的激活，而且制剂也具有通过在制剂中包含的药剂所提供的更多的益处。例如，疫苗可以与葡聚糖组合，转运给巨噬细胞，被其内吞并呈递，引发抗原特异的和葡聚糖调控的免疫应答。

本发明的另一个作用是诱导有效的保护性的免疫应答。因此，本发明的组合物的一个重要要素是组合物能够优先激活并诱导免疫细胞的增殖和/或募集，以及在存在所述药剂的情况下，激活并诱导针对特异靶点的免疫应答。在此所述的组合物的佐剂性能促进了特异的免疫应答。此外，可以想象本发明的组合物还可以包括抗原组分和/或免疫调节剂。与抗原药剂的组合物还可以促进建立所需的免疫应答，并容许形成免疫记忆。

### $\beta$ -葡聚糖组合物所包含的药剂

#### 抗原/抗体

在一个方面，本发明提供了包括抗原或免疫原性表位的药剂。包括免疫原性表位的化合物或分子是那些能诱导免疫应答的药剂。“免疫原性表位”被定义为当整个药剂是免疫原时引发免疫应答的药剂的一部分。这些免疫原性表位一般限于分子中的数个位点。对于本发明的目的，术语“免疫原”或“免疫原性表位”并不限于诱导单独的体液应答或单独的细胞应答。更正确地是，用本术语表示化合物、分子或药剂能够诱导细胞和体液免疫应答之一或者两者。

关于选择具有免疫原性表位的药剂在本领域是公知的，特殊的构象优先地诱导出了特殊形式的免疫应答。例如，通过一组简单的化学规则可以表征出如蛋白的一级序列中所经常表示的能引发蛋白反应性血清的肽，其并不限于完整蛋白的免疫优势区（即免疫原性表位），也不限于氨基或羧基末端。例如，抗体可以针对于病毒的蛋白包膜。

## 抗生素

在某些实施方式中，组合物包括  $\beta(1,3;1,6)$ -葡聚糖和抗生素。抗生素也称作抗微生物药物，其是对抗细菌引起的感染的药物。在二十世纪 40 年代发现抗生素以来，它们变革了医疗保健以及显著地降低了感染性疾病的发病率和死亡率。但是，在过去的数十年里，抗生素所控制的细菌发展出了对这些药物的耐药性。今天，事实上美国和全世界的所有重要的细菌感染都正成为耐药的。基于此原因，抗生素耐药是 CDC 所关注的头等问题。

抗生素包括青霉素、头孢菌素、大环内酯（红霉素和其相关物）、磺胺或磺胺类、甲氧苄啶-磺胺甲噁唑、呋喃妥因、氨基糖甙和多粘菌素 B 等。在本发明中用作药剂的一种具体抗生素是环丙沙星。

绝大多数抗生素是青霉素或头孢菌素，在过去数年中，已经给这些分子进行了化学变化，以提供它们抗细菌的能力以及帮助它们克服耐药细菌的降解和“免疫性”。

## 疫苗

在某些实施方式中，组合物包括  $\beta(1,3;1,6)$ -葡聚糖和疫苗。已经开发出预防一些明显的病毒源性的人类疾病的疫苗。根据疫苗的活性药剂的性能，病毒疫苗一般可以被分成下面的三组：(i) 活体减毒疫苗；(ii) 灭活疫苗；和 (iii) 亚单位疫苗。这些类型疫苗中的每种都具有各自的独特的优点和生产方式。活体减毒疫苗例如模拟天然感染并因此刺激长时间的抗体生成，诱导好的细胞介导的应答，以及诱导侵入时的抗性。一般在原代细胞株、鸡胚和二倍体细胞株中生成这些疫苗。相反地，灭活或死疫苗通常仅仅刺激简单的免疫应答，并因此需要定期的强化。

## 流感疫苗

在某些实施方式中，组合物包括  $\beta(1,3;1,6)$ -葡聚糖和流感疫苗。肠外

施用 (射击样注射) 的流感疫苗是灭活 (死) 流感疫苗。鼻-流感疫苗是活体减毒流感疫苗, 其含有与射击注射用的死疫苗有所不同的减弱病毒。当病毒被喷入到鼻内时, 它们刺激机体的免疫系统发生将预防天然存在的流感疫苗的感染的保护性抗体。这些病毒是减毒的, 意味着它们是冷适应的, 以及温度敏感意味着它们能生长在鼻腔和胸腔内, 但是不能生长在温度较高的下呼吸道内。

#### 抗病毒剂以及抗病毒剂与流感病毒疫苗

在某些实施方式中, 组合物包括  $\beta(1,3;1,6)$ -葡聚糖和抗病毒剂。在另一个实施方式中, 组合物包括  $\beta(1,3;1,6)$ -葡聚糖、流感病毒疫苗和抗病毒剂。根据疾病控制中心 (CDC) 的资料, 目前认证并可商品化获得四种抗病毒药物 (金刚烷胺、金刚乙胺、扎那米韦和奥塞米韦)。这些药物在预防健康成人体的流感病毒引起的疾病方面有着约 70%到 90%有效性。

如果在发病的 2 天内服用药物, 这些药物能减少流感的症状以及缩短发病时间 1 或 2 天。抗病毒药物也使得流感病毒被更少地传播给其他人。

这些抗病毒药物的用途经常是被用于控制研究所 (例如护理院、医院) 或巡航船只或其他设施中的流感的爆发。在爆发事件中, 公共健康实践是使用流感病毒疫苗和抗病毒剂。

在某些实施方式中, 组合物包括  $\beta(1,3;1,6)$ -葡聚糖和抗黄病毒剂。黄病毒是小的、有被膜的正链 RNA 病毒家族的成员, 它的一些成员对全球公共健康提出了现实的或潜在的威胁。例如, 日本脑炎是严重的公共健康问题, 它涉及远东地区的数百万高危的个体。登革病毒已经是单个最重要的节肢动物传播的人类疾病, 估计全球每年发病率为 100 万例初次登革热病例以及超过 450,000 例登革出血热病例。

其他黄病毒继续引起可变性能的地方病, 当出现气候和媒介种群的变化以及人类活动所引起的环境干扰时, 它们具有迁移到新地域内的能



力。这些黄病毒包括例如圣路易斯脑炎病毒，它在美国的中西部、东南部和西部引起散发的、但严重的、急性的疾病；西尼罗病毒，它引起发热性病变，偶尔伴有急性脑炎，广泛地分布于非洲、中东、前苏联的全部以及欧洲的一部分；墨莱溪谷脑炎病毒，它引起澳大利亚的地方性的神经系统病变；以及蜱传脑炎病毒，它分布于前苏联和东欧的各地，其中硬蜱媒介在这些区域是流行的，并造成了严重形式的脑炎。

丙型肝炎病毒 (HCV) 是黄病毒家族的另一个成员，它的基因组构造和复制策略与上面所提及的那些黄病毒相似，但不完全相同。HCV 几乎都是通过肠外途径和先天感染来传播的，其与能进展为肝硬化和肝细胞癌的慢性肝炎相关，以及它是美国要求原位肝移植的肝脏疾病的首要病因。

### 鼻病毒

在某些实施方式中，组合物包括  $\beta(1,3;1,6)$ -葡聚糖和抗鼻病毒剂。鼻病毒是普通感冒的最常见的原因，归功于 30-50% 的病例。感冒是上呼吸道的急性感染，特征是持续 2 到 7 天的鼻卡他、喷嚏、流泪、鼻咽部痒、头痛、咽喉痛、畏寒和无力，很少或没有发热，可以伴有喉炎、气管炎和支气管炎；继发的细菌感染可以造成急性中耳炎、鼻窦炎或肺炎。

鼻病毒 (RV) 是小的、无包膜的病毒，在其二十面体 (具有 20 个面的) 核衣壳中含有单链的核糖核酸 (RNA) 基因组。RV 属于小核糖核酸病毒科，其包括肠病毒属 (脊髓灰质炎病毒、A 和 B 组柯莎奇病毒、埃可病毒、有限的肠病毒) 和肝病毒 (甲型肝炎病毒)。目前鉴定出了近 101 种血清型。

普通感冒最常见的是与鼻病毒相关。部分病例的鼻咽炎、哮喘和肺炎是由 RV 引起的。RV 还在中耳炎和哮喘急性发作中起到了重要的致病作用。

RV 可以经飞沫或直接接触传播。接种的主要位点是鼻粘膜，尽管有

时也会累及结膜。RV 粘附于呼吸道上皮并局灶地传播。主要的人 RV 受体是细胞间粘附分子-1 (ICAM-1)。人体防御系统对损伤的天然应答包括 ICAM-1, 其有助于内皮细胞和白细胞之间的结合。RV 通过将 ICAM-1 作为其粘附的受体而利用 ICAM-1。一些 RV 血清型也上调了人体上皮细胞上的 ICAM-1 表达, 以便增加感染的易感性。

RV 复制的最佳环境是 33 到 35°C。RV 在体温下不会有效地复制。这可以解释 RV 为什么会在鼻通道和上气管支气管树内很好地复制, 但是在下呼吸道内却不能很好地复制。潜伏期是大约 2 到 3 天。

RV 大量地脱落, 每毫升鼻吸液中有 100 万个感染性病毒体。病毒脱落可以出现在患者认识到感冒症状前的数天, 在发病的第 2 到 7 天达到高峰, 并且可以持续 3 到 4 周。

对呼吸道内的病毒的局灶的炎性应答可以造成鼻涕、鼻塞、喷嚏和喉部瘙痒。对鼻部上皮的损伤不会发生, 炎症是由细胞因子和其他介质的生成所介导的。

鼻分泌物中的组胺浓度不会增加。在发病第 3 到 5 天时, 鼻涕可以变成粘脓性的, 这是因为作为对化学趋化因子例如白介素-8 的应答而已经迁移到感染部位的多形核白细胞。鼻粘膜纤毛转运在发病期间被显著地减少了, 并且可以被损伤持续数周。分泌型免疫球蛋白 A 和血清抗体都涉及缓解病变以及保护避免再感染。

冠状病毒、副流感病毒的再感染、和呼吸道合胞病毒 (RSV) 是可以引起普通感冒的最为重要的多种其他的病毒。其他病毒 (例如腺病毒、流感病毒) 也可以引起普通感冒, 但更可能引起急性鼻咽炎和更为严重的呼吸道感染。

支原体肺炎在发展成更为广泛的呼吸道疾病之前偶尔可以出现普通感冒的症状。其他病原体包括粗球孢子菌、荚膜组织胞浆菌、百日咳杆菌、鹦鹉热衣原体、和伯纳特立克次体。

最新的临床研究说明了普通感冒中的鼻窦受累。患有普通感冒的成

人具有 CT 扫描异常 (例如透过性下降、气液平、粘膜增厚), 不经过抗生素的治疗, 它可以在 1 到 2 周内恢复正常。

在某些实施方式中, 组合物包括  $\beta(1,3;1,6)$ -葡聚糖和普来可那立。普来可那立是病毒的核衣壳结合抑制剂, 其具有抗鼻病毒和肠病毒的大多数血清型的强力的和高特异的体外活性。

### WGP 葡聚糖的制备

简言之, 用于产生全葡聚糖颗粒的方法包括从酵母或真菌的细胞壁中提取并纯化出碱不可溶的全葡聚糖颗粒。该方法生成了保留如在体内所发现的葡聚糖的形态和结构性能的产物。

全葡聚糖制剂的结构-功能性能直接地依赖于其所获得的来源以及最终产物的纯度。全葡聚糖的来源可以是酵母或其他真菌、或任一其他含有具有在此所述的性能的葡聚糖的来源。在某些实施方式中, 酵母细胞是葡聚糖优选的来源。在本方法中所采用的酵母株可以是任一酵母菌株, 包括例如啤酒糖酵母(*S. cerevisiae*)、戴耳克氏糖酵母(*S. delbrueckii*)、罗茜糖酵母(*S. rosei*)、小椭圆糖酵母(*S. microellipsodes*)、卡尔斯伯糖酵母(*S. carlsbergensis*)、二孢糖酵母(*S. bisporus*)、发酵性糖酵母(*S. fermentati*)、鲁氏糖酵母(*S. rouxii*)、粟酒裂殖糖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)、多孢克鲁维氏酵母(*Kluyveromyces polysporus*)、白色假丝酵母(*Candida albicans*)、阴沟假丝酵母(*C. cloacae*)、热带假丝酵母(*C. tropicalis*)、产脲假丝酵母(*C. utilis*)、温奇氏汉逊氏酵母(*Hansenula wingei*)、*H. arni*、亨利氏汉逊氏酵母(*H. henricii*)、美国汉逊氏酵母(*H. americana*)、加拿大汉逊氏酵母(*H. canadiensis*)、碎囊汉逊氏酵母(*H. capsulata*)、多形汉逊氏酵母(*H. polymorpha*)、克鲁弗利氏毕赤氏酵母(*Pichia kluyveri*)、巴斯德毕赤氏酵母(*P. pastoris*)、多形毕赤氏酵母(*P. polymorpha*)、罗丹纳毕赤氏酵母(*P. rhodanensis*)、奥默列氏毕赤氏酵母(*P. ohmeri*)、牛球拟酵母(*Torulopsis bovin*)、和光滑球拟酵母(*T. glabrata*)。

一般而言，可以用上面的方法制备并分离其他的突变酵母菌株和作为原材料的其他亲代菌株。另外，可以采用诱变剂诱导突变，例如化学诱变剂、辐射、或其他 DNA 或重组处理。可以相似地采用其他的选择或筛选技术。

用本领域已知的方法可以生成酵母细胞。常用的生长培养基包括例如葡萄糖、蛋白胨和酵母提取物。用常用于分离生物体与液体培养基的方法可以收集并从生长培养基中分离出酵母细胞。这些方法常常采用固体-液体分离方法例如过滤或离心。在本方法中，优选地收集中到晚期对数生长期的细胞，使得酵母细胞中的糖原和壳多糖的量最小化。糖原、壳多糖和蛋白是不需要的污染物，其影响全葡聚糖颗粒的生物学和流体力学的性能。

全葡聚糖颗粒的制备包括用合适浓度的水性碱溶液处理酵母，以溶解一部分酵母并形成碱-氢氧化物不可溶的主要具有  $\beta(1,6)$ -和  $\beta(1,3)$ -连接的全葡聚糖颗粒。常常被采用的碱是碱-金属氢氧化物，例如氢氧化钠或氢氧化钾或等价物。原材料可以包括从生长培养基中分离到的酵母。当用较少浓缩的酵母组合物作为原材料时，控制水性氢氧化物反应物的消耗以及优选范围内的反应物浓度是更为困难的。酵母应当具有完整的、未破坏的细胞壁，因为本全葡聚糖颗粒的优选的性能依赖于完整的细胞壁。

在水性氢氧化物溶液中处理酵母。细胞内组分和酵母细胞的甘露糖蛋白部分被溶解于水性氢氧化物溶液中，留下基本上没有蛋白和具有基本上没有被变更的三维基质  $\beta(1,6)$ -或  $\beta(1,3)$ -连接的葡聚糖的不可溶的细胞壁物质。进行该步骤的优选的条件造成了细胞壁的甘露糖组分被溶解于水性氢氧化物溶液内。细胞内组分被水解并释放到可溶相内。消化的条件是至少使得细胞的大部分（细胞壁的三维基质结构）不会被破坏的条件。在特殊的情况中，基本上所有的细胞壁葡聚糖仍没有被变更并保持完整。

在某些实施方式中，在具有从约 0.1 到约 10.0 的初始当量浓度的氢氧化物溶液中进行水性氢氧化物消化步骤。常用的氢氧化物溶液包括碱金属组和周期表中的碱土金属的氢氧化物。优选的水性氢氧化物溶液是钠或钾，这是因为它们的可用性。可以在从约 20°C 到约 121°C 的温度下进行消化，更低的温度需要更长的消化时间。当氢氧化钠被用作水性氢氧化物时，温度可以从约 80°C 到约 100°C，以及溶液具有从约 0.75 到约 1.5 的初始当量浓度。所添加的氢氧化物超过了所需的量，因此，不需要再次添加。

一般使用从每升氢氧化物溶液约 10 到约 500 克干酵母。在某些实施方式中，用一系列的接触步骤进行水性氢氧化物消化步骤，使得残余污染物例如蛋白的量要比仅仅利用一个接触步骤中的量更少。在某些实施方式中，需要去除细胞的所有蛋白物质。这样的去除要进行到使得不可溶的细胞壁葡聚糖颗粒中剩余的蛋白的量小于百分之一的程度。优选地在具有 pH 值从约 2.0 到约 6.0 的弱酸溶液中进行附加的提取步骤。常用的弱酸溶液包括盐酸、用盐酸调整到所需 pH 值的氯化钠以及乙酸缓冲液。其他常用的弱酸溶液是硫酸以及合适缓冲液中的乙酸。优选地在从约 20°C 到约 100°C 的温度下进行该提取步骤。如果必要或需要，被消化的葡聚糖颗粒可以被进一步地洗涤和提取，以便降低蛋白和污染物的水平。在处理产物之后，pH 值可以被调整到约 6.0 到约 7.8 的范围内。

通过实施这个没有破坏细胞壁步骤的过程，可以在比包括破坏细胞壁步骤的已有技术方法中的可能条件更为严格的 pH 值和温度条件下进行提取。即本发明的方法避免了产物降解，同时采用了这些容许消除耗时的多个提取步骤的严格的提取条件。

在上面的水性氢氧化物处理步骤之后，最终的全葡聚糖产物包括酵母细胞的最初重量的约 5 到约 30%，产物优选地是约 7 到约 15% 重量。在本发明的内容中设定了所产生的水性氢氧化物不可溶的全葡聚糖颗粒。如需可以进一步地处理和/或进一步地纯化全葡聚糖颗粒。例如，葡

聚糖可以被干燥成细粉末 (例如通过在烤箱中干燥); 或者可以用有机溶剂 (例如乙醇、乙醚、丙酮、甲基乙基酮、氯仿) 处理葡聚糖以便去除任一微量的或有机可溶的物质, 或者用氢氧化物溶液再处理以去除其他蛋白或可能存在的其他杂质。

在某些实施方式中, 从本方法中获得的全葡聚糖颗粒包括纯的葡聚糖, 其主要是由 $\beta(1,6)$ -和 $\beta(1,3)$ -连接的葡聚糖构成。全葡聚糖颗粒含有很少量的蛋白和糖原的污染物。在某些实施方式中, 全葡聚糖颗粒的性状是球形的, 其直径为约 2 到约 10 微米, 并且含有约 85%重量的己糖 (或者在其他实施方式中, 超过约 60%己糖)、近 1%重量的蛋白以及小于 1%的可检测到量的甘露聚糖, 如用单糖分析或其他合适的分析所测定到的那样。用先前方法所获得的葡聚糖基本上比本发明的葡聚糖含有更大量的壳多糖和葡聚糖。

如上所设定的第二步包括通过化学处理改变葡聚糖的性能来修饰如上所生成的全葡聚糖颗粒。本发明预期除了在此所述的那些具体的菌株之外, 还可以使用源自任一酵母菌株的全葡聚糖颗粒。如上面所提及的那样, 可以使用非常广谱的酵母或突变酵母菌株。上面所述的处理条件也普遍适用于真菌的葡聚糖提取物。这些葡聚糖的性能也将依赖于它们所来源的来源。

根据第一次化学处理, 可以用酸处理全葡聚糖颗粒, 以减少 $\beta(1,6)$ -连键的量, 因此改变所述葡聚糖的流体力学性能, 如增加这些修饰葡聚糖的水溶液的粘性所证实的那样。

也可以使用通过用酸处理葡聚糖颗粒一段合适的时间以变更 $\beta(1,6)$ -连键来制备变更了的全葡聚糖颗粒的方法。乙酸是优选的, 因为其弱酸性、便利操作、低毒性、低费用和可获得性, 但是可以使用其他的酸。这些酸一般足够弱到限制 $\beta(1,3)$ -连键的水解。在基本上仅仅影响 $\beta(1,6)$ -连接的葡聚糖的条件下进行处理。在某些实施方式中, 用基本上由乙酸或其任一稀释液 (常用的稀释剂是有机溶剂或无机酸溶液) 构成的液体

进行酸处理。在从约 20°C 到约 100°C 的温度下进行处理。在某些实施方式中，处理被进行到去除了从约 3% 到约 20% 酸可溶性物质重量 (基于处理前的全葡聚糖颗粒的总重量) 的程度。在其他实施方式中，去除的程度是从约 3% 到约 4% 重量。在处理后的某些组合物具有变更了的流体力学性能以及粘度的增加。

根据第二次化学处理，用酶或酸处理全葡聚糖颗粒，以便改变 $\beta(1,3)$ -连键的量。对于源自一些酵母菌株的全葡聚糖颗粒，酶处理引起了粘度的降低，以及对于其他的情况，酶处理引起了粘度的增加，但是普遍地变更了所形成的葡聚糖的化学和流体力学的性能。所述处理是用 $\beta(1,3)$ -葡聚糖酶例如昆布糖酶的处理，所述处理被用于变更 $\beta(1,3)$ -连键以便变更水性悬浮液中的全葡聚糖颗粒的流体力学性能。

可以在具有从每升约 0.1 到约 10.0 克葡聚糖浓度的水溶液中进行酶处理。可以使用任一水解的葡聚糖酶例如昆布多糖酶，其是有效的和容易获得的。依赖于全葡聚糖颗粒的浓度和葡聚糖酶，孵育的时间可以有所不同。 $\beta(1,3)$ -连键能耐受弱酸例如乙酸的水解作用。强的或浓缩的酸例如盐酸 (HCl)、硫酸 ( $H_2SO_4$ ) 或甲酸的处理能水解 $\beta(1,3)$ -连键，据此减少 $\beta(1,3)$ -连键的量。可以在具有从每升约 0.1 到约 10.0 克葡聚糖浓度的水溶液中进行酸处理。依赖于全葡聚糖颗粒的浓度和酸，孵育的时间可以有所不同。可以在从约 20°C 到约 100°C 的温度下进行酸水解。优选的所形成的组合物具有变更了的流体力学性能。

通过控制孵育时间，控制所形成的产物的化学和流体力学性能是有可能的。例如，对于特殊的用途例如用于各种食物产品，可以精细地控制产物粘度。

根据最终的公式，具有变更了的连接的终末处理的产物的流体力学参数 ( $K_1$ ) 依赖于处理时间：

$$K_1 = -0.0021 (\text{时间}) + 0.26$$

其中时间以分钟计，而且

时间小于 1 个小时。

参数  $K_1$  与相对粘性直接相关(成比例)。对于水性悬浮液, 相对粘性等于实际粘性, 其中后者的测量单位是厘泊。

提供了一种用于制备具有预定粘性的葡聚糖的浆液(aqueous slurry)的方法。浆液包括一定浓度的葡聚糖, 其中浓度是预定粘性的函数, 根据下面的近似公式:

$$1/\text{浓度} = K_1 \times (1/\log(\text{相对粘性})) + K_2$$

其中:

$K_1 = (\text{形状因子}) \times (\text{流体力学体积})$ ; 而

$K_2 = (\text{流体力学体积})/(\text{最大包装率})$ 。

形状因子是经验性测定的描述葡聚糖基质在其水性环境中的形状的数值。形状因子是颗粒的长宽比的函数, 可以显微镜下测定出其数值。流体力学体积(hydrodynamic volume)是对颗粒在悬浮液中所占据的体积的测定值。这是葡聚糖悬浮液的重要参数, 其中它表示葡聚糖基质的高的控水能力。最大包装率可以被描述为能聚集成单位体积悬浮液的最大可获得体积分数的葡聚糖。

#### 微颗粒的 $\beta$ -葡聚糖颗粒的制备

用本领域技术人员已知的常用方法可以从酵母细胞壁中分离出  $\beta(1,3)$ -葡聚糖原材料。用于从酵母中生产葡聚糖的一般方法包括碱提取和随后的酸提取 (Hassid et al, Journal of the American Chemical Society, 63:295-298, 1941)。在美国专利 No. 5,223,491 中描述了用于分离纯化的水不可溶的  $\beta(1,3)$ -葡聚糖的改良方法, 在此通过引用将其全部内容并入本申请。在美国专利 No. 5,702,719 中阐述了用于制备微颗粒的  $\beta$ -葡聚糖的方法, 在此通过引用将其全部内容并入本申请。也可以获得平均颗粒大小在约 1.0 微米或更小或约 2.0 微米或更小的微颗粒的葡聚糖产物。用机械方法例如利用搅拌器、微流器或球磨机可以缩小  $\beta$ -葡聚糖的尺寸。例如,



可以用具有钝刀片的搅拌器缩小颗粒的尺寸，其中搅拌葡聚糖混合物一段足够长的时间，优选地是数分钟，以便将颗粒磨碎到所需的尺寸，且没有使得混合物过热。另一种搅拌方法包括在具有 10mm 不锈钢研磨球的球磨机中研磨葡聚糖颗粒。后一研磨方法是特别优选地，当所需的颗粒大小为约 0.2 微米或更小时。

在研磨之前，将葡聚糖混合物优选地流经一系列的筛，每个连续筛都具有比前一筛更小的筛孔大小，最后的筛孔大小约为 80。过筛混合物的目的是从更小的颗粒中分离出更大的和更粗糙的葡聚糖颗粒 (80 网筛的孔径大小约为 0.007 英寸或 0.178mm)。然后，将所分离出的更大的颗粒如上所述地研磨，并用 80 的终末筛孔尺寸重新过筛。重复过筛和研磨过程，直到获得了 80 的终末筛孔尺寸。组合所筛出的颗粒，并再次研磨，优选地至少研磨 1 小时，直到获得了所需的颗粒大小，优选地约为 1.0 微米或更小，更优选地约 0.20 微米或更小。在研磨过程中定期地取出细研磨的葡聚糖的样本，并用显微镜上的千分尺进行测量。

## 药物剂型

### 施用

可以依次施用、共同施用或多个剂量施用全葡聚糖颗粒和药剂。此外，施用的顺序是相互互换的。

### 剂型

在本发明的实践中所适用的口服剂型包括胶囊、凝胶、扁胶囊、片剂、泡腾片或非泡腾片的粉末或片剂、粉末或颗粒；作为水性或非水性液体中的溶液或悬浮液；或者作为水包油液态乳剂或油包水乳剂；或者鼻内转运的剂型。本发明的化合物也可以作为丸剂、舔剂或糊剂。

一般而言，通过均匀混合活性组分和液态载体或者精细分离的固相载体或者两者，如果需要然后塑形产物来制备剂型。根据所选的施用的

途径和标准的药物实践选择药物载体。每种载体都必须是“可用的”，意思是与剂型中的其它组分相兼容并且对对象无害。该载体可以是固体的或液体的，以及一般根据所用的施用类型选择载体类型。合适的固体载体的实例包括乳糖、蔗糖、明胶、琼脂和大块粉剂。合适的液体载体包括水、可药用脂肪和油脂、乙醇或其它有机溶剂，包括酯、乳剂、糖浆剂或酞剂、悬浮液、溶液和/或悬浮液、和从非泡腾颗粒中重建的溶液和/或悬浮液以及从泡腾颗粒中重建的泡腾制剂。这些液体载体可以含有例如合适的溶剂、防腐剂、乳化剂、悬浮剂、稀释剂、甜味剂、增厚剂和融化剂。优选的载体是食用油，例如玉米油或菜籽油。聚乙二醇例如 PEG 也是优选的载体。

口服施用的剂型可以包括无毒的、可药用的、惰性的载体，例如乳糖、淀粉、蔗糖、葡萄糖、甲基纤维素、硬脂酸镁、磷酸二钙、硫酸钙、甘露醇、山梨糖醇、环糊精、环糊精衍生物等。

如果需要，本组合物也可以含有少量的湿化剂或乳化剂、或 pH 缓冲剂。本组合物可以是液体溶液、悬浮液、乳剂、片剂、丸剂、胶囊、持续释放剂型、或粉末。本组合物和传统的结合剂和载体例如甘油可以被制剂成栓剂。口服剂型可以包括标准载体例如药物级甘露醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、聚乙烯吡咯酮、糖精钠、纤维素、碳酸镁等。用于吸入的雾化剂型可以包括氯化钠、糖精钠或 sorbitani trioleas，其中经吹气器内的压缩二氧化碳剂型的吸入物可以包括 1,1,1,2-四氟乙烯、单氟三氯乙烯、四氟二氯乙烯或二氟二氯乙烯。

可以容易地制剂出胶囊或片剂，并且可以被制成容易吞咽或咀嚼。片剂可以含有合适的载体、结合剂、润滑剂、稀释剂、崩解剂、着色剂、调味剂、气体诱导剂、或融化剂。可以压缩或塑形制备片剂，任选地与一种或多种附加的组分。通过压缩无流动形式（例如粉末、胶囊）的活性组分可以制备出压缩片剂，活性组分任选地与结合剂（例如凝胶、羟丙基甲基纤维素）、润滑剂、惰性稀释剂、防腐剂、崩解剂（例如淀粉羟乙酸

钠、交联的羧甲基纤维素)、表面活性的或分散剂一起混合。合适的结合剂包括淀粉、凝胶、天然糖例如葡萄糖或 $\beta$ -半乳糖、玉米甜味剂、天然的和合成的口香糖例如阿拉伯胶、西黄蓍胶、海藻酸钠、羧甲基纤维素、聚乙二醇、石蜡等。在这些剂型形式中所用的润滑剂包括油酸钠、硬脂酸钠、硬脂酸镁、苯甲酸钠、乙酸钠、氯化钠等。崩解剂包括例如淀粉、甲基纤维素、琼脂、浆土、黄单胞菌胶等。通过在合适的机器中塑形经惰性液体稀释剂湿化的粉末状的活性组分的混合物可以制成塑形片剂。

片剂可以任选地被涂覆或压痕，以及可以被制剂成能提供活性组分的缓慢释放或可控制释放。也可以任选地给片剂提供肠溶涂层，以便提供在肠道部分而不是在胃内释放活性组分。

在 1975 年 9 月 2 日提交的 Robert 的美国专利 No. 3,903,297 中描述了可以被用于制剂崩解的口服剂量形式的示例的可药用载体和赋形剂，在此通过引用将其全部内容并入本申请。在下面的参考文献中描述了用于制备本发明所用的剂量形式的技术和组合物：7 *Modern Pharmaceutics*, Chapters 9 and 10 (Banker & Rhodes, Editors, 1979); Lieberman et al, *Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets* (1981); 和 Ansel, *Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms 2nd Edition* (1976)。在某些实施方式中，所施用的葡聚糖的剂量选自从约 0 到约 6,000mg/天的范围或从约 0 到约 100mg/kg/天的范围。例如，剂量可以是约 66.6 $\mu$ g/天到约 200 $\mu$ g/天或约 666.6 $\mu$ g/天。

适合于肠外施用的剂型包括水性的和非水性的与预期受体的血液等张的剂型；以及水性的和非水性的无菌的悬浮液，其可以包括被设计用于将组合物靶向于血液组分或一个或多个器官的悬浮系统。剂型可以存在于单一剂量或多个剂量的密封的容器内，例如安瓿或小瓶。可以从先前所述的无菌的粉末、胶囊和片剂中制备出临时的注射溶液和悬浮液。肠外和静脉内形式可以包括矿物质以及其它使得它们与所选的注射类型或转运系统相兼容的物质。

在此通过引用将所采用的全部文献的全部内容并入本申请。现在用下面的实施例举例说明本发明，其并非打算进行任何形式的限制。

## 实施例

### 实施例 1：利用试验小鼠的流感模型评价免疫调节剂的保护作用

#### 试验条件

32 只 Balb/c 小鼠被分成了 4 组，每组 8 只小鼠。

组 1：阴性对照 (管饲 H<sub>2</sub>O)；

组 2：Imucell WGP 葡聚糖 (Biopolymer Engineering，每 100ml H<sub>2</sub>O 含有 20mg/kg)；

组 3：阴性对照 (未处理)。

在连续 8 天内，组 1 和 2 中的小鼠口服接受了相应的治疗 (用 B-D 20 号针管进行管饲)。

在末次管饲 1 个或 2 个小时后，麻醉所有四组中的小鼠，然后在我们实验室内，用 10 LD<sub>50</sub> (10<sup>2.56</sup> TCID<sub>50</sub>) 的适合于在小鼠内生长的人流感病毒 A/PR/8/34 鼻内感染小鼠。

每个试验组都被分成了两个亚组，以便测定肺部的病毒载量：

- 亚组 1：在感染后第 5 天，杀死每组中的 4 只动物 (50%动物)，以便使用两种不同的技术 (HAU 和 TCID<sub>50</sub>) 评价肺部的病毒载量。
- 亚组 2：随诊每组中的另外 4 只动物 (50%动物)，以便评价第 14 天时的生存率。

规律地 (每 2 到 3 天) 测定每只动物的体重：

- 开始管饲之前
- 第 0 天(感染)
- 感染后第 3 天
- 感染后第 5 天

- 感染后第 7 天
- 所有动物 (除了一只) 在感染后第 9 天死亡

结果显示于 4 个表中。

- (1) 表 1: 感染后的体重和体重变化 (%体重下降) 的计算 (亚组 1: 感染后第 5 天被杀死的用于评价肺部的病毒载量的动物)。
- (2) 表 2: 用两种技术 (HAU 和 TCID<sub>50</sub>) 计算出的病毒载量。
- (3) 表 3: 感染后的体重和体重变化 (%体重下降) 的计算 (亚组 2)。
- (4) 表 4: 感染后第 14 天的生存率 (亚组 2)。

表 1、感染后的体重和体重变化 (%体重下降) 的计算 (亚组 1: 感染后第 5 天被杀死的动物)

治疗 (小鼠编号)	体重 (克)				%体重下降		
	管饲	感染	感染后第 3 天	感染后第 5 天	管饲	感染后第 3 天	感染后第 5 天
H <sub>2</sub> O (1#)	15.58	16.18	14.85	12.05	NA	8.2	25.5
H <sub>2</sub> O (2#)	15.21	16.28	13.52	13.62	NA	16.9	16.3
H <sub>2</sub> O (3#)	15.75	16.34	14.85	14.11	NA	9.1	13.6
H <sub>2</sub> O (5#)	16.18	17.10	15.27	14.63	NA	10.7	14.4
平均值	15.68	16.48	14.62	13.60	NA	11.23	17.45
SD	0.40	0.42	0.76	1.11		3.92	548
WGP 葡聚糖 (17#)	16.54	17.01	15.18	13.17	NA	10.7	22.5
WGP 葡聚糖 (18#)	16.96	17.31	15.28	15.11	NA	11.7	12.7
WGP 葡聚糖 (19#)	16.88	17.18	15.93	13.09	NA	7.2	23.8
WGP 葡聚糖 (20#)	17.47	17.70	15.95	13.77	NA	9.8	22.2
平均值	16.96	17.30	15.59	13.79	NA	9.85	20.3
SD	0.38	0.29	0.41	0.93		1.93	5.11
未处理 (#25)	16.42	17.32	15.90	14.23	NA	8.1	17.8
未处理 (#26)	15.99	15.80	14.72	12.25	NA	6.8	22.4
未处理 (#27)	14.85	14.73	14.77	12.50	NA	5.5	20.0
未处理 (#28)	13.80	16.16	13.48	11.33	NA	8.4	23.0
平均值	15.27	16.0	14.72	12.58	NA	7.2	20.8
SD	1.18	1.07	0.99	1.21		1.33	235

NA: 不适用 (即动物没有出现体重下降)

结论:

在所有 4 组动物中没有发现显著的体重下降的变化。在两组阴性对照组 (组 1 和 4) 中, 没有观察到体重的显著变化。

这个观察与先前用这个试验动物模型所得到的结果相似, 用 10 LD<sub>50</sub> 感染动物以及在感染后第 5 天杀死动物。

此外, 在两个试验组 (组 2 和 3) 中也没有体重下降的变化。

表 2: 肺部的病毒载量 (感染后第 5 天 (亚组 1))

	HAU/ml	TCID <sub>50</sub> /ml
治疗 (小鼠编号)		
H <sub>2</sub> O (1#)	20	10 <sup>3.4</sup>
H <sub>2</sub> O (2#)	20	10 <sup>3.5</sup>
H <sub>2</sub> O (3#)	120	10 <sup>4.5</sup>
H <sub>2</sub> O (5#)	80	10 <sup>5</sup>
平均值	60	10 <sup>4.1</sup>
SD	49	
WGP 葡聚糖 (17#)	160	10 <sup>4.75</sup>
WGP 葡聚糖 (18#)	20	10 <sup>4.5</sup>
WGP 葡聚糖 (19#)	20	10 <sup>3.5</sup>
WGP 葡聚糖 (20#)	60	10 <sup>4.75</sup>
平均值	65	10 <sup>4.4</sup>
SD	66	
未处理 (#25)	80	10 <sup>4.2</sup>
未处理 (#26)	80	10 <sup>4.6</sup>
未处理 (#27)	80	10 <sup>5.2</sup>
未处理 (#28)	40	10 <sup>4.4</sup>
平均值	70	10 <sup>4.6</sup>
SD	20	

结论:

与阴性对照 (组 1 和 3) 比较, 试验动物组 (组 2) 中的病毒载量没有减少。

但是, 这是个小试验, 所用动物的数目是非常有限的。此外, 两种技术都显示出了很大的个体变异性。

表 3: 感染后的体重和体重变化 (%体重下降) 的计算 (亚组 2)

治疗 (小鼠编号)	体重 (克)					%体重下降			
	管饲	感染	感染后 第 3 天	感染后 第 5 天	感染后 第 7 天	管饲	第 3 天	第 5 天	第 7 天
H <sub>2</sub> O (4#)	18.38	18.19	死亡			NA			
H <sub>2</sub> O (6#)	18.07	18.64	17.63	15.30	13.58	NA	5.4	17.9	27.15
H <sub>2</sub> O (7#)	17.25	17.35	15.60	12.94	12.09	NA	10.1	25.4	30.32
H <sub>2</sub> O (8#)	14.16	14.87	13.45	11.58	10.00	NA	9.5	22.1	32.75
平均值	16.97	17.26	12.23	13.27	11.89	NA	8.33	21.80	30.07
WGP 葡聚糖 (21#)	14.90	15.15	16.50	11.50	10.17	NA	8.9	24.0	32.87
WGP 葡聚糖 (22#)	15.59	16.39	15.05	12.95	死亡	NA	8.1	20.9	-
WGP 葡聚糖 (23#)	16.08	17.84	13.25	14.88	12.78	NA	25.7	16.5	28.36
WGP 葡聚糖 (24#)	16.02	16.89	15.70	14.72	13.17	NA	7.0	12.8	22.02
平均值	15.65	16.57	15.13	13.51	12.04	NA	12.43	18.55	27.75
SD	0.54	1.12	1.38	1.60	1.63	NA	8.88	4.92	5.45
未处理 (#29)	15.02	16.16	14.47	12.75	11.28	NA	10.4	20.8	30.20
未处理 (#30)	17.12	18.31	16.34	14.05	12.27	NA	10.7	23.2	32.99
未处理 (#31)	16.27	17.70	15.90	13.53	11.95	NA	10.1	23.5	32.49
未处理 (#32)	15.51	16.30	14.79	13.10	11.67	NA	9.8	16.9	28.40
平均值	15.98	17.12	15.38	13.36	11.79	NA	10.25	21.10	31.02
SD	0.92	1.06	0.89	0.56	0.42		0.39	3.05	2.13

NA: 不适用 (即动物没有出现体重下降)

结论: 在第 7 天计算出体重下降, 主要是因为很少动物在感染后第 9

天仍存活 (见表 4)。

当与组 3 (未治疗的阴性对照) 比较时, 组 2 的动物 (WGP 葡聚糖) 的体重下降似乎要比对照组更少。但是, 这种差异不是显著的, 因为本试验中只有很少数目的动物。

表 4、经 10 LD<sub>50</sub> 感染后动物的存活 (亚组 2)

组/小鼠编号	感染后 第 7 天	感染后 第 9 天	感染后 第 11 天	感染后 第 12 天	感染后 第 13 天	感染后 第 14 天
H <sub>2</sub> O (#1)	3/4	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
WGP 葡聚糖 (#3)	3/4	2/4	2/4	1/4	1/4	37989
未治疗 (#4)	4/4	0/4	0/4	0/4	0/4	37989

结论:

唯一我们能看到保护倾向的组是 WGP 葡聚糖治疗组 (组 3)。在本组中, 50%动物存活超过了第 9 天, 而所有其它组的所有动物在第 9 天都已经死亡。

仅有一只动物在感染后第 12 天死亡, 该动物体重在第 11 天时已经下降了 38.28%。

在感染后第 14 天观察本组动物, 仅有一只动物存活, 该动物的体重在第 11 天已经下降了 35.17%, 以及在感染后第 14 天已经下降了 40.67%, 但是该动物看上去仍是健康的。

综上所述, 与阴性对照比较, 仅仅在利用 WGP 葡聚糖组观察到了保护倾向。

## 实施例 2

材料和方法

平均生存时间和总生存模型

BALB/C 雌性、6 到 8 周大的新到的小鼠



经皮下感染的炭疽杆菌

攻击剂量从 1 LD<sub>50</sub> 到 10 LD<sub>50</sub>

根据药物和试验，口服或皮下给予免疫调节剂。第-2 天单剂量施用，第-7 到 0 天多剂量施用。

在攻击后第 10 天进行试验。

图 2 到 7 显示了该试验的数据。

表 5

	单独	Cipro	疫苗 1X	疫苗 2X
对照	4.3 0/10	4.8 0/8	5.6 1/8	5.0 1/8
WGP 66.6µg	5.6 0/10	7.1 1/10	7.0 2/10	7.6 2/10
WGP 200µg	6.8 2/10	8.3 3/10	8.1 3/8	8.5 4/8
WGP 666.7µg	7.6 3/10	6.4 0/10	8.3 4/8	9.0 5/8

平均生存时间 x.y 总生存时间 x/y；粗体 P≤0.05

表 6 环丙沙星治疗的生存时间的增加

	未治疗	环丙沙星
未治疗	4.3	4.8
66.6µg BEI-O-201	5.6	7.1

攻击剂量为 10 LD<sub>50</sub> 炭疽杆菌。从开始炭疽攻击 7 天前开始，每天 8 次施用 66.6µg WGP (BEI-O-201, Biopolymer Engineering Inc., Eagan, MN)。在攻击前 1 天，皮下施用 0.1ml 体积的脂质体包裹的环丙沙星。t 检验发现斜体的数据与对照有着统计学差异 (p<0.05)。

表 7

	未治疗	疫苗 1X	疫苗 2X
未治疗	0/10	1/8	1/8
66.6µg WGP	2/10	2/8	2/8
200µg WGP	2/10	3/8	4/8
666.6µg WGP	3/10	4/8	5/8

表 7 是显示攻击剂量为 10 LD<sub>50</sub> 炭疽杆菌的图表。从开始炭疽攻击 7 天前开始，每天 8 次施用 WGP。在炭疽攻击前第 7 天单独 (疫苗 1X) 或第 7 天和第 1 天 (疫苗 2X) 施用疫苗。结果显示，Fischer Exact 检验发现斜体结果与未治疗的对照有着统计学差异 ( $p < 0.05$ )。

虽然参照优选的实施方式已经具体地显示并描述了本发明，但是本领域技术人员要明白可以进行各种形式和细节的变化，只要不脱离附录的权利要求书所包含的本发明的范围。

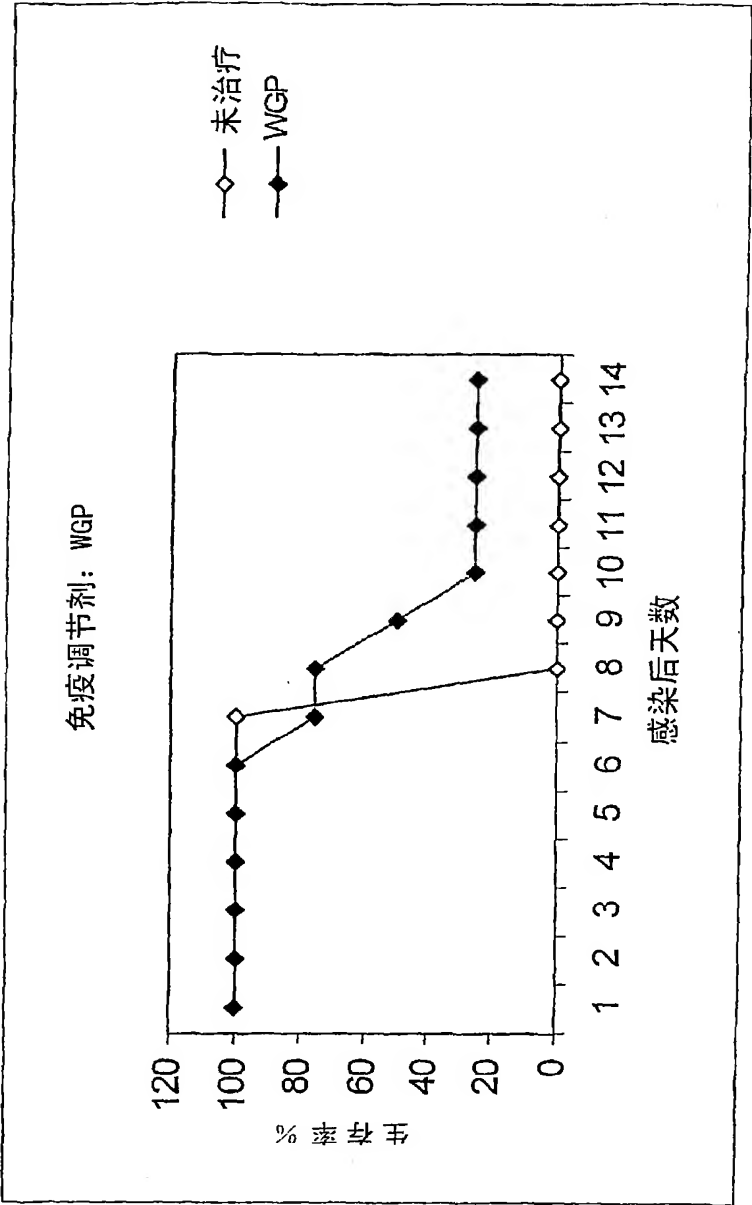


图1

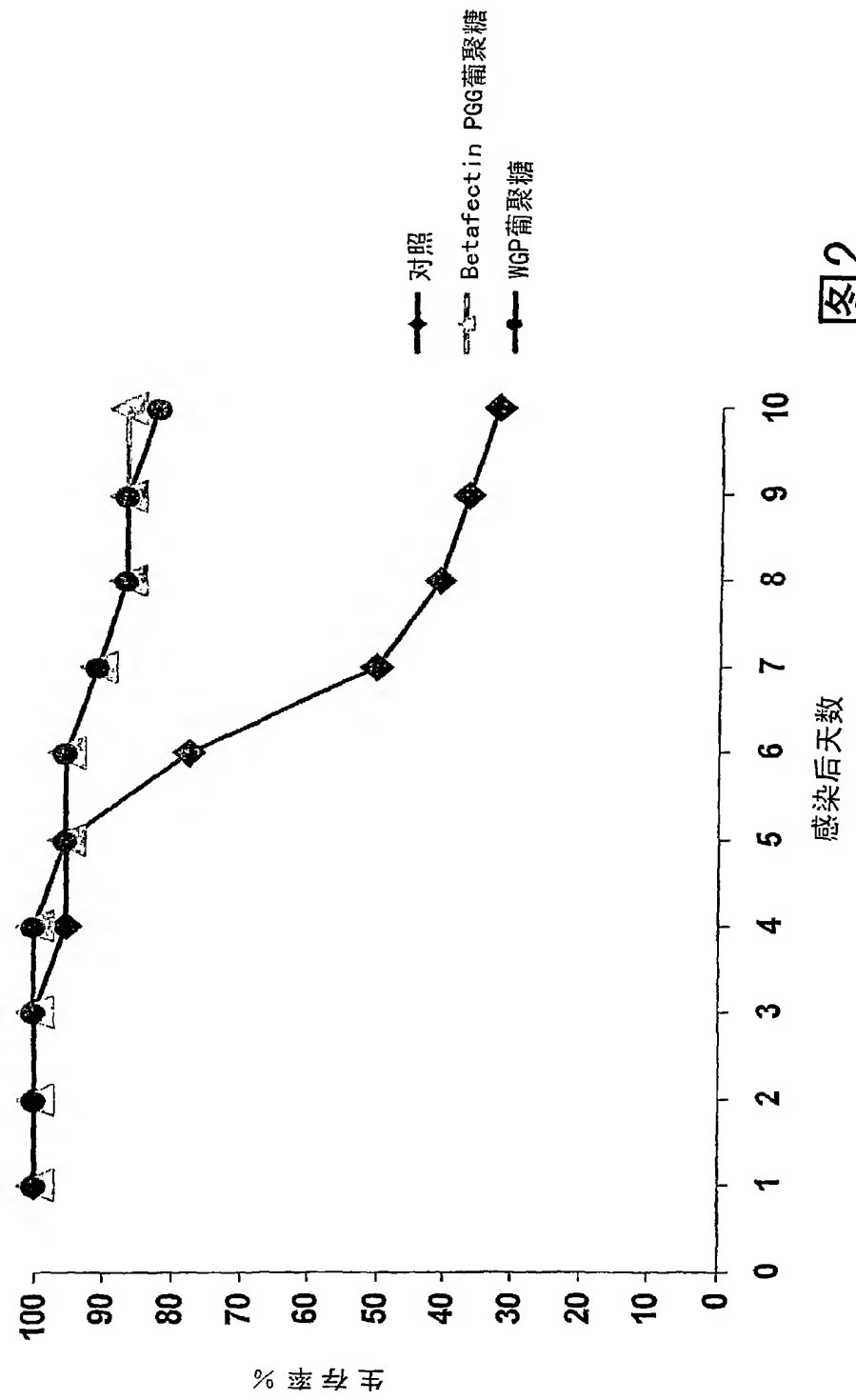
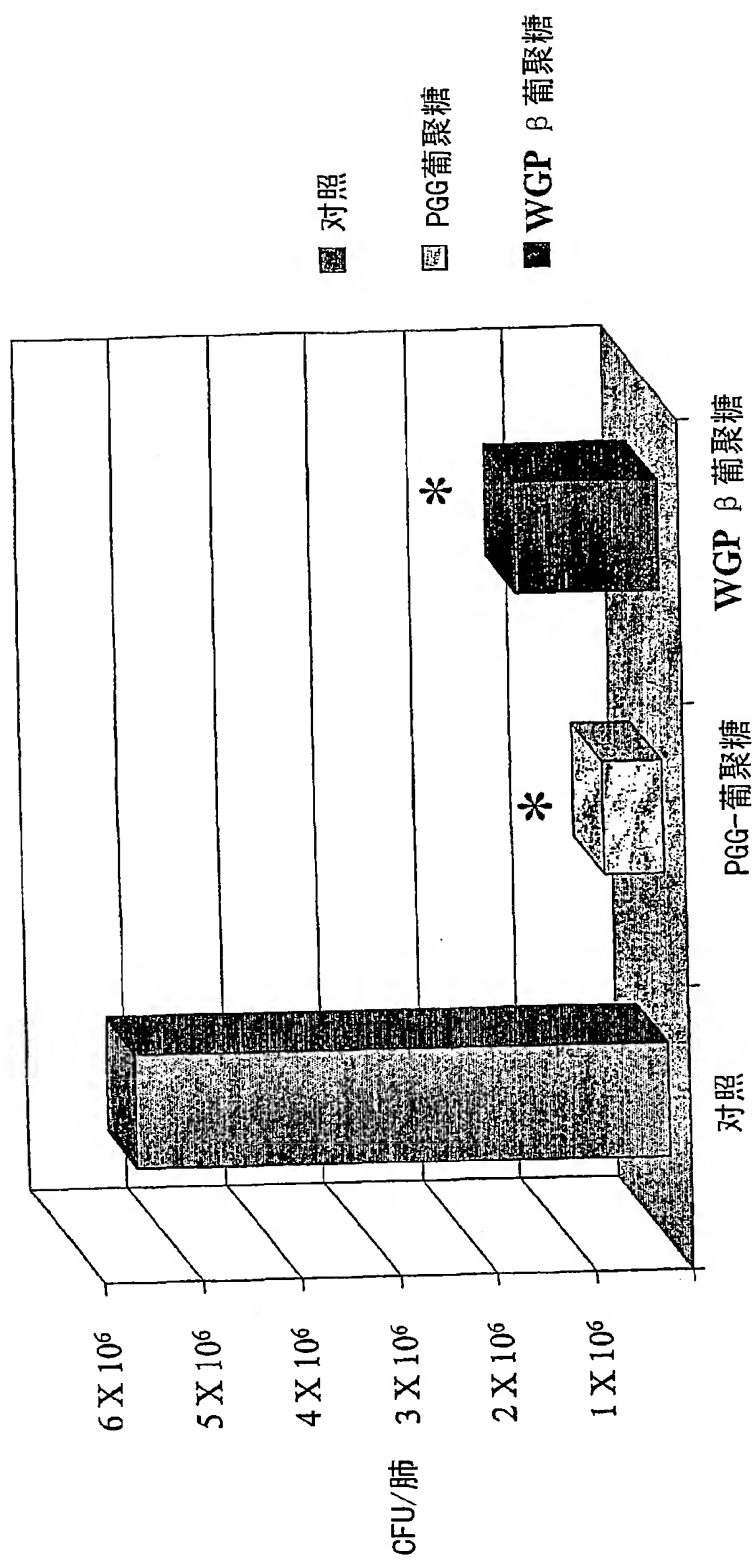


图2



治疗 \* p<0.05

图3

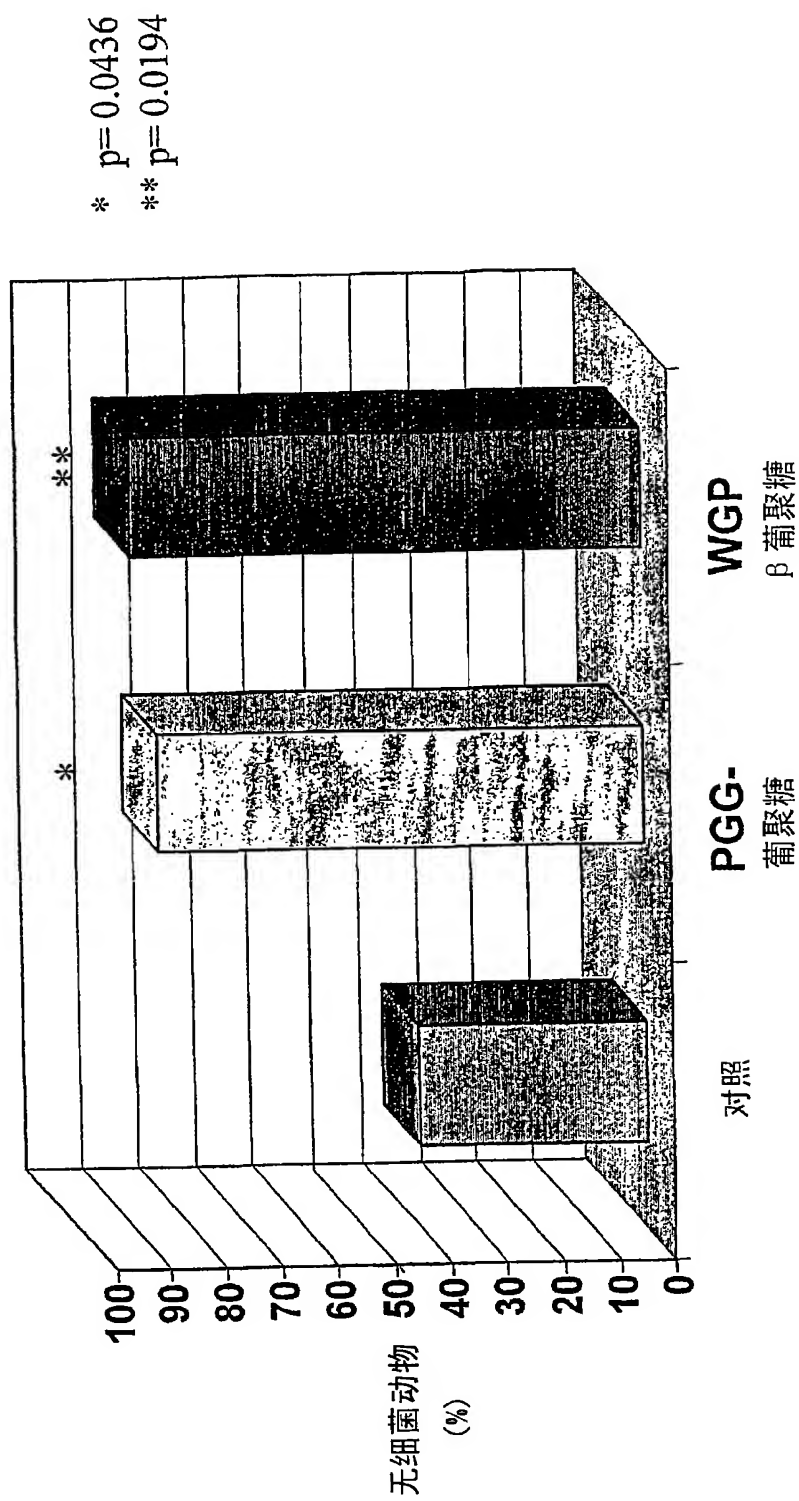


图4

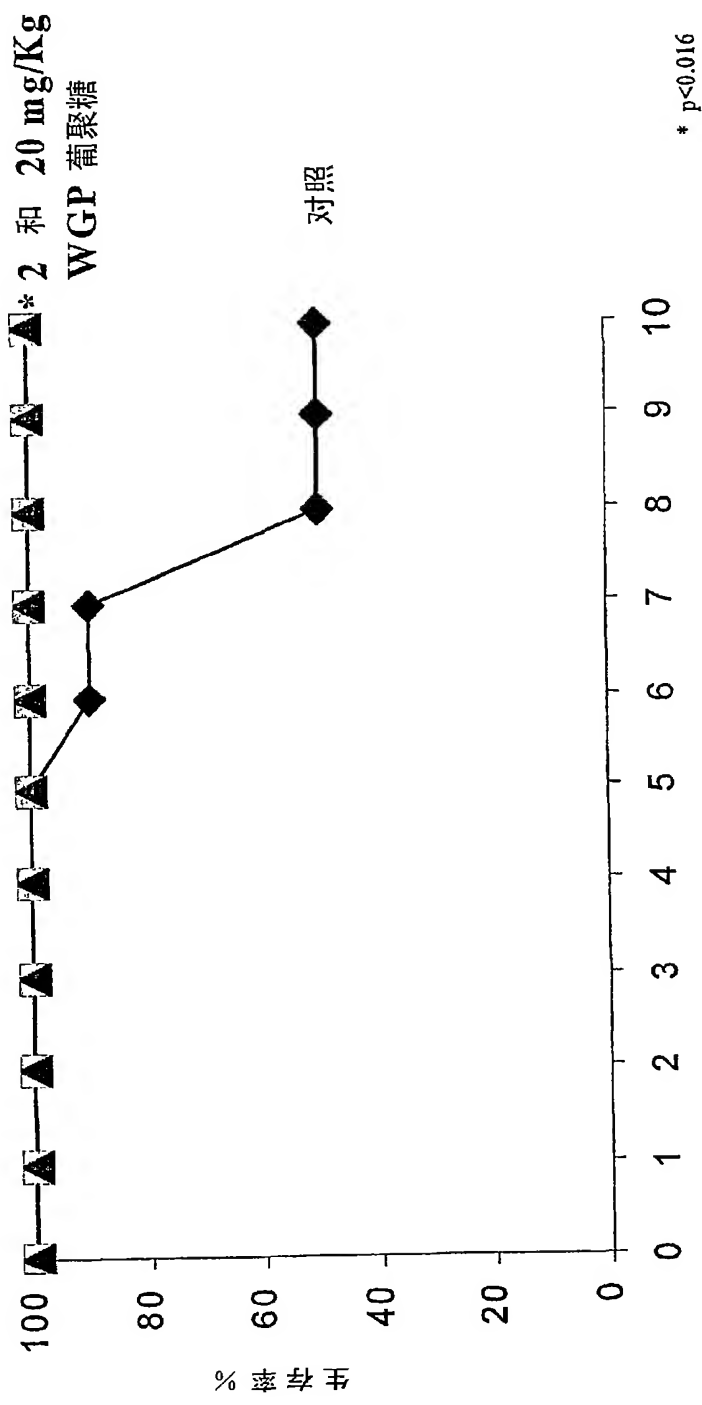


图5

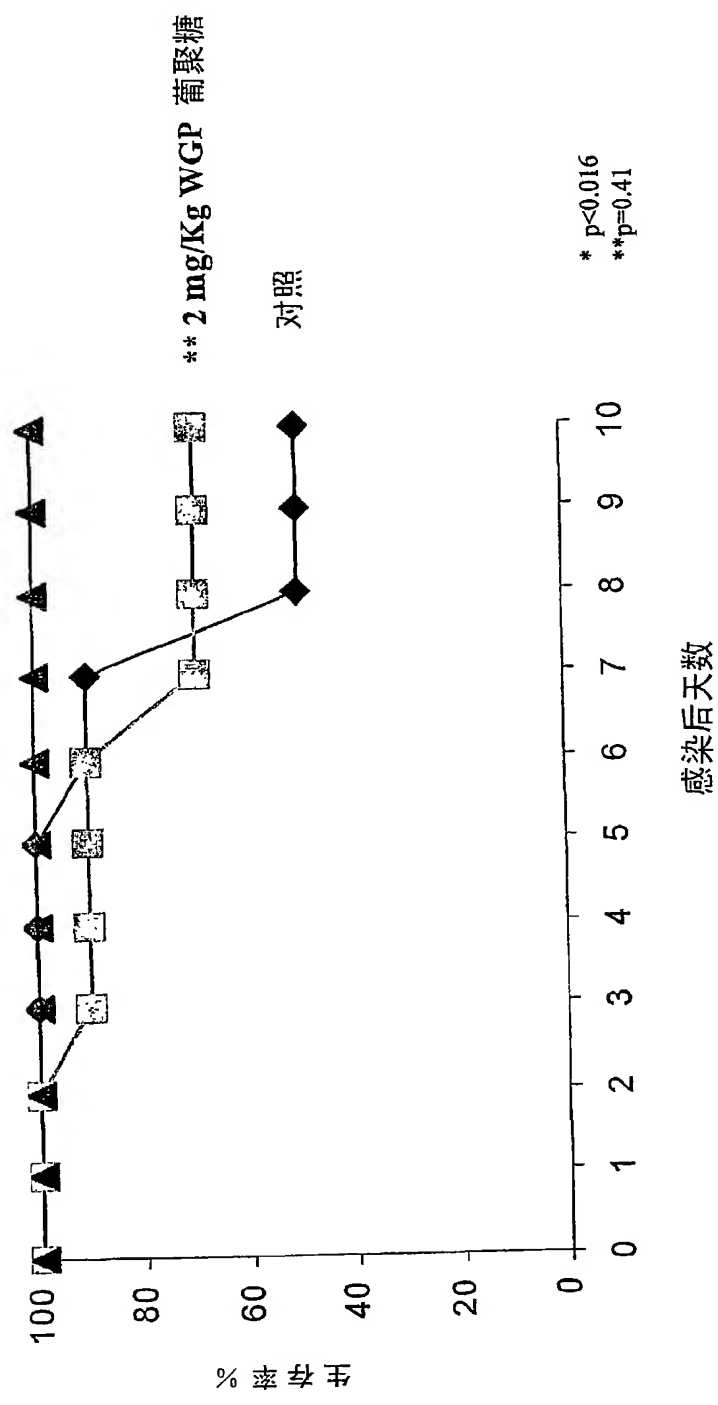


图6



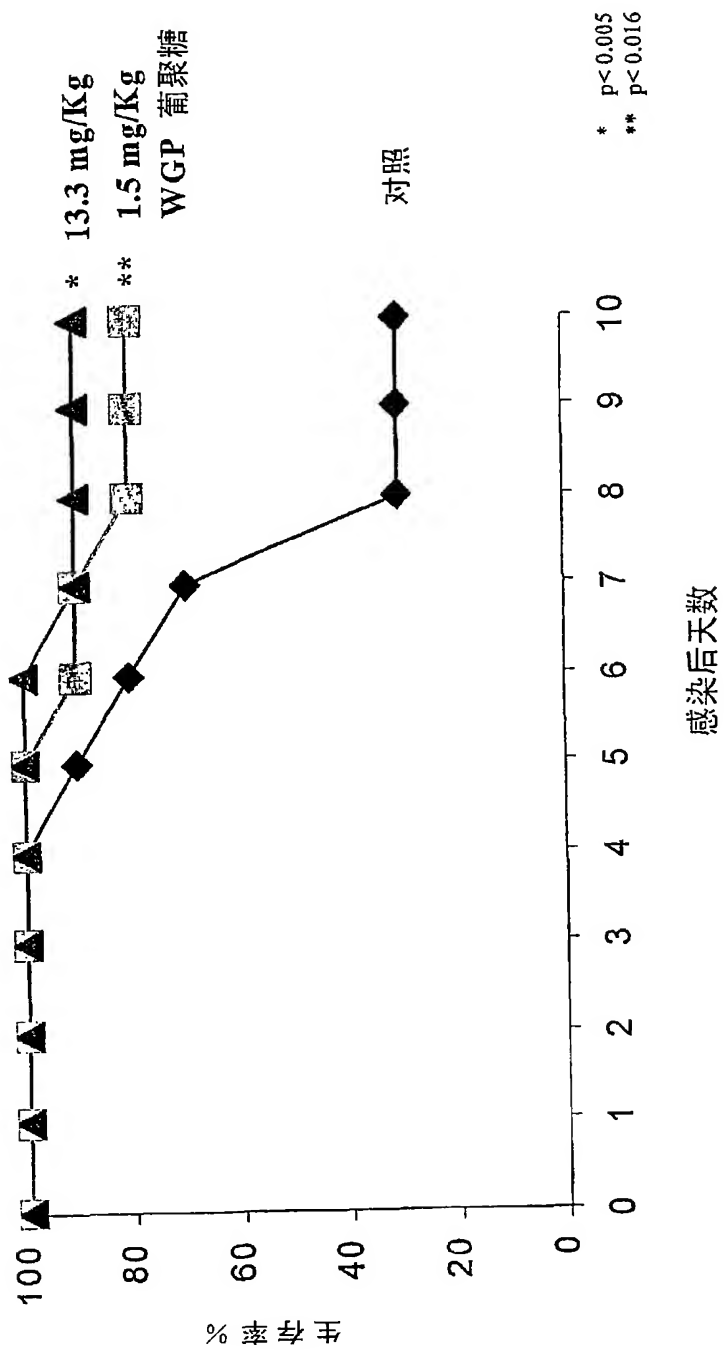


图7

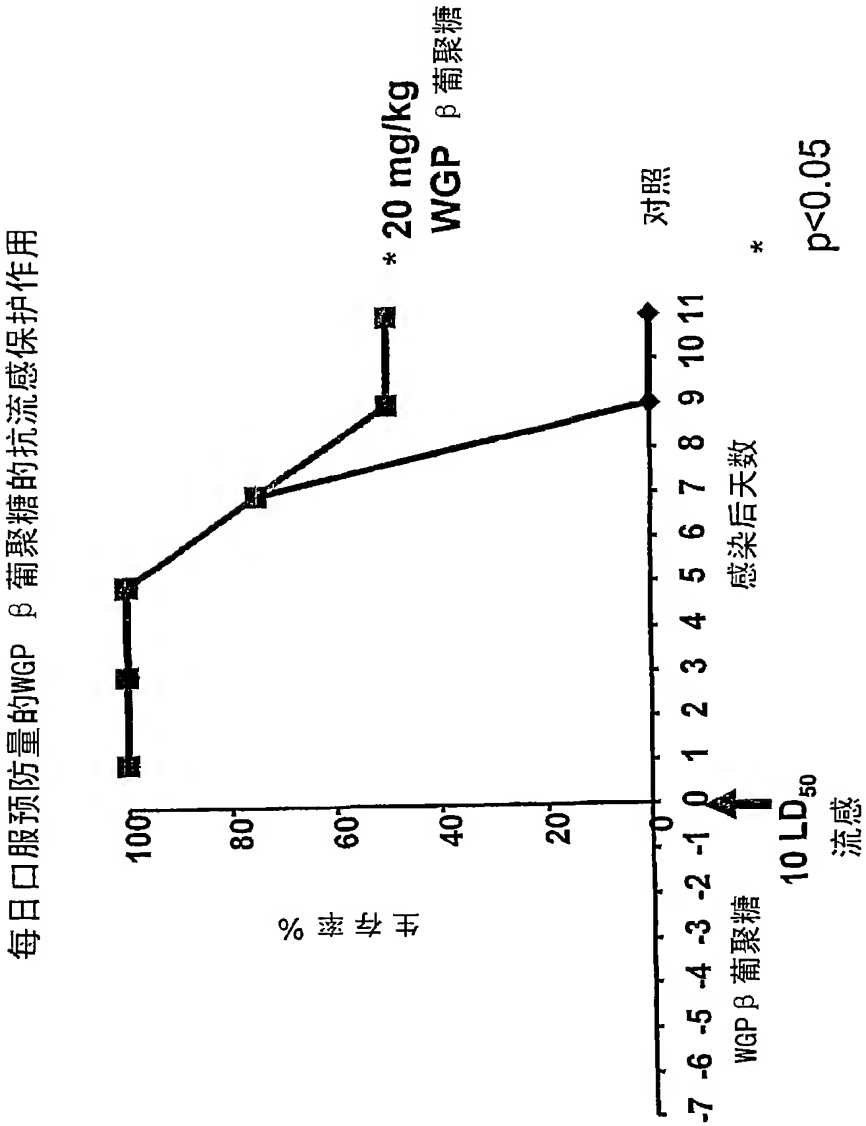


图8

